

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 63-074499

(43)Date of publication of application : 04.04.1988

(51)Int.Cl.

C12Q 1/00

G01N 31/22

(21)Application number : 61-220100

(71)Applicant : UNITIKA LTD

(22)Date of filing : 18.09.1986

(72)Inventor : MATSUI KAZUHIRO  
KONDO HITOSHI  
NAGATA KAZUHIKO

## (54) REAGENT FOR DETERMINATION OF INORGANIC PHOSPHORUS

## (57)Abstract:

PURPOSE: To provide the titled reagent composed of a glutamine synthetase, adenosine diphosphate, glutamine and metal ion and capable of determining inorganic phosphorus in a specimen without being influenced with ascorbic acid in a short time at a low cost without necessitating any pretreatment.

CONSTITUTION: (A) 0.01W100U/ml of a glutamine synthetase originated from a microbial strain having optimum growth temperature of 50W85° C such as Bacillus stearothermophilus, (B) 0.05W100mM of adenosine diphosphate, (C) 1W200mM of glutamine and (D) a metal ion donor such as 1W100mM of MgCl<sub>2</sub> or 1W10mM of MnCl<sub>2</sub> are compounded optionally together with e.g. (E) glucose and (F) a buffer solution such as imidazole hydrochloride buffer solution.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(1) [JP-A-S63-74499]

(Translation of lines 3-18 in page 4 of the specification)

Furthermore, measurement principle for the reagents when glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is used involves generation of 1,3-diphosphoglyceraldehyde-3-phosphate and NADH from glyceraldehyde-3-phosphate and  $\text{NAD}^+$  by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase followed by measurement of inorganic phosphorus with absorbance of the NADH. However, because glyceraldehyde-3-phosphate is an unstable substrate, a system to generate glyceraldehyde-3-phosphate from fructose diphosphate as a substrate using aldolase and triosephosphate isomerase must be further added to the reagents. In addition, in order to incline the balance of the entire reaction system toward consumption of inorganic phosphorus, ADP, 3-phosphoglycerate kinase, glucose, hexokinase and the like must be added as a system for consuming the produced ATP.

## ⑫ 公開特許公報(A)

昭63-74499

⑬ Int. Cl.<sup>4</sup>C 12 Q 1/00  
G 01 N 31/22

識別記号

G A A

庁内整理番号

Z-8412-4B  
8506-2G

⑭ 公開 昭和63年(1988)4月4日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全8頁)

⑮ 発明の名称 無機リン定量用試薬

⑯ 特 願 昭61-220100

⑰ 出 願 昭61(1986)9月18日

⑱ 発 明 者 松 井 一 裕 京都府宇治市宇治小桜23番地 ユニチカ株式会社中央研究所内  
 ⑲ 発 明 者 近 藤 仁 司 京都府宇治市宇治小桜23番地 ユニチカ株式会社中央研究所内  
 ⑲ 発 明 者 永 田 和 彦 京都府宇治市宇治小桜23番地 ユニチカ株式会社中央研究所内  
 ⑳ 出 願 人 ユニチカ株式会社 兵庫県尼崎市東本町1丁目50番地

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

無機リン定量用試薬

## 2. 特許請求の範囲

(1) グルタミンシンセターゼ、アデノシンニリン酸、グルタミン及び金属イオンからなる無機リン定量用試薬。

## 3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、試料中の無機リンを定量する無機リン定量用試薬に関するものである。

(従来の技術)

現在、無機リンの測定は、フィスケ サバロー (Fiske-Subbarow) 法に代表されるように試料にモリブデン酸塩を加えた後、塩化第一スズ、アミノナフトールスルホン酸、ヒドラジン、アスコルビン酸、硫酸第一鉄、マラカイトグリーンなどの還元剤を加えることによって生成するモリブデン青を比色する方法が一般的である。しかし、これ

らの方法においては、重金属であるモリブデンを含む廃液を生じる他に、使用する機器の腐食や色素の吸着が生じるという問題がある。また、血清中の無機リンを測定するためには、除蛋白操作あるいはトリクロロ酢酸を添加するなど前処理を必要とすることも迅速で多量の試料を測定することの障害となる。

そこで、モリブデン廃液を生じず、前処理の必要のない無機リンの測定法として酵素法が数種提案されている。この測定法に用いられる試薬としてホスホリラーゼ a を用いる試薬 (バイオケミシエ ツアイトシユリフト Biochemische Zeitschrift 344 巻 212 頁 1966 年、アナリテイカル バイオケミストリー Analytical Biochemistry 19 巻 300 頁 1967 年)、グリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素を用いる試薬 (アナリテイカル バイオケミストリー Analytical Biochemistry 45 巻 277 頁 1972 年)、マルトースホスホリラーゼを用いる試薬 (特開昭 56-39799 号公報)、ビルビン酸オ

キシダーゼを用いる試薬(特公昭59-15637号公報)、プリンスクレオシドホスホリラーゼを用いる試薬(アナリテイカル バイオケミストリー Analytical Biochemistry 55巻 379頁 1973年、アグリカルチュラル バイオロジカル ケミストリー Agricultural Biological Chemistry 45巻 1801頁 1981年)がある。

(発明が解決しようとする問題点)

しかしながら、上記の酵素法に用いられる試薬は、以下に述べるような種々の問題点を有している。

すなわち、ホスホリラーゼaを用いる試薬の測定原理はグリコーゲンと無機リンとからホスホリラーゼaによって生じさせたグルコース1リン酸をホスホグルコムターゼによってグルコース6リン酸に変換させた後、このグルコース6リン酸と $\text{NADP}^+$ とからグルコース6リン酸脱水素酵素によって生成した $\text{NADPH}$ の吸光度で測定するものであるが、この試薬はホスホリラーゼaの無機リンに対する $K_m$ 値が数mMと大きいため、血清な

どの1mM以下の無機リン含有試料を測定するには、反応終結までの時間が長くなるという問題がある。

また、グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素を用いる試薬の測定原理はグリセルアルデヒド3リン酸と無機リン及び $\text{NAD}^+$ をグリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素によって1,3-ジホスホグリセルアルデヒド3リン酸及び $\text{NADH}$ を生じさせて、この $\text{NADH}$ の吸光度をもって無機リンを測定するものであるが、この試薬はグリセルアルデヒド3リン酸が不安定な基質であるため、さらにフルクトース二リン酸を基質としてアルドラーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼを用いてグリセルアルデヒド3リン酸を生じさせる系を付加する必要がある。しかも、反応系全体の平衡を無機リンの消費方向に傾けるには生成したATPを消費させる系としてADP、3ホスホグリセロキナーゼ、グルコース、ヘキソキナーゼなどを付加する必要がある。このため、この試薬は無機リン定量のための本質的な反応系の他に3種類の酵素とこれらの基質を必要とするため、複雑で高

- 3 -

価な試薬系となる。

次にマルトースホスホリラーゼを用いる試薬の測定原理はマルトースと無機リンとからマルトースホスホリラーゼによって生じさせた $\beta$ -グルコース1リン酸を $\beta$ -ホスホグルコムターゼによって $\beta$ -グルコース6リン酸に変換させた後、この $\beta$ -グルコース6リン酸と $\text{NADP}^+$ とからグルコース6リン酸脱水素酵素によって生成した $\text{NADPH}$ の吸光度で測定するものであるが、この試薬は前記したホスホリラーゼaを用いる試薬と同じく、マルトースホスホリラーゼの無機リンに対する $K_m$ 値が大きいと、血清などの1mM以下の無機リン含有試料を測定するには、反応終結までの時間が長くなるという問題がある。

さらにビルビン酸オキシダーゼを用いる試薬の測定原理はビルビン酸と無機リンとからビルビン酸オキシダーゼによって生じさせた過酸化水素をペルオキシダーゼによって4-アミノアンチピリンとフェノール等を縮合、発色させる系に導いて測定するものであるが、この試薬は比色するため、

常に無機リン標準液を用いて無機リンの定量を行なわなければならない。また、分子状酸素を必要とすることから、試料中の溶存酸素の不足の問題が生じる他、試料中のアスコルビン酸などの共存物質の影響を受けるため、それらを共存物質ごとに前処理を行わなければならないという問題がある。さらにはビルビン酸オキシダーゼ溶液は極めて不安定であるという問題がある。

また、プリンスクレオシドホスホリラーゼを用いる試薬の測定原理はイノシンと無機リンとからプリンスクレオシドホスホリラーゼによって生じさせたヒポキサンチンをキサンチンオキシダーゼによって酸化させて過酸化水素を発生させ、発生させた過酸化水素をペルオキシダーゼによって4-アミノアンチピリンとフェノール等を縮合、発色させる系に導いて測定するものであるが、この試薬は前記したビルビン酸オキシダーゼを用いる試薬と同様の問題がある。

(問題点を解決するための手段)

本発明者らは、上記のごとき酵素法に用いられ

- 6 -

- 5 -

る試薬の問題点を解決するために鋭意研究した結果、無機リン定量用試薬にグルタミンシンセターゼが利用できることを見出し、本発明に到達したものである。

すなわち、本発明はグルタミンシンセターゼ、アデノシン二リン酸、グルタミン及び金属イオンからなる無機リン定量用試薬を要旨とするものである。

本発明の試薬はグルタミンシンセターゼ、アデノシン二リン酸(ADP)、グルタミン及びマグネシウムイオン又はマンガンイオンなどの金属イオンが主成分であり、この他に、反応により生成するグルタミン酸を検出する酵素系、アデノシン三リン酸(ATP)を検出する酵素系又はアンモニアを検出する酵素系を含んでいる。このATPを検出する酵素系(①)としては、例えば、ヘキソキナーゼ又はグルコキナーゼ、グルコース6リン酸脱水素酵素、グルコース、NADP<sup>+</sup>を主成分とする酵素系があげられ、また、グルタミン酸を検出する酵素系(②)としては、例えばグルタミン

酸デヒドロゲナーゼ、NADP<sup>+</sup>又はNAD<sup>+</sup>を主成分とする酵素系があげられ、さらに、アンモニアを検出する酵素系(③)としては、例えば、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、2-オキソグルタル酸、NADPH又はNADHを主成分とする酵素系があげられる。

本発明の試薬は上記以外に通常の賦活剤を含んでいてもよい。

本発明の試薬の各成分の濃度としては、例えば、ADPを0.05~100mM、グルタミンを1~200mM、塩化マグネシウムを1~100mM、又は塩化マンガンを1~10mM、グルタミンシンセターゼを0.01~100 U/mℓとなるように使用すればよく、特にADPを0.1~20mM、グルタミンを20~50mM、塩化マグネシウムを10~20mM、グルタミンシンセターゼを20~50 U/mℓとなるように使用することが好ましい。

また、ATPを検出する酵素系(①)の各成分の濃度としては、例えば、グルコースを0.1~100 mM、NADP<sup>+</sup>を0.1~50mM、ヘキソキナーゼ又

- 7 -

はグルコキナーゼを0.01~100 U/mℓ、グルコース6リン酸脱水素酵素を0.01~100 U/mℓとなるように使用することが好ましく、特に、グルコースを1~20 mM、NADP<sup>+</sup>を0.5~5 mM、ヘキソキナーゼ又はグルコキナーゼを1~10 U/mℓ、グルコース6リン酸脱水素酵素を0.1~10 U/mℓとなるように使用することが好ましい。

グルタミン酸を検出する酵素系(②)の各成分の濃度としては、例えば、NAD<sup>+</sup>又はNADP<sup>+</sup>を0.1~50 mM、グルタミン酸脱水素酵素を1~100 U/mℓとなるように使用することが好ましく、特に、NAD<sup>+</sup>又はNADP<sup>+</sup>を0.5~50 mM、グルタミン酸脱水素酵素を10~100 U/mℓとなるように使用することが好ましい。

アンモニアを検出する酵素系(③)の各成分の濃度としては、例えば、2-オキソグルタル酸を0.1~10 mM、NADH又はNADPHを0.05~0.5 mM、グルタミン酸脱水素酵素を0.1~50 U/mℓとなるように使用することが好ましい。

本発明に用いられるグルタミンシンセターゼと

- 8 -

しては、試薬全体の安定性を高めるため、最適生育温度が50℃ないし85℃である微生物由来のものが好ましい。そのような微生物としては、例えばバチルス・ステアロサーモフィルス、バチルス・サーモプロテオリカス、バチルス・アシドカルダリウスなどのバチルス属、サーモアクチノマイセス属、サーマス属、サーモミクロビウム属などの微生物があげられる。これらの中でも特にバチルス・ステアロサーモフィルスが好ましく、その具体例としては、ATCC 7933、7954、10194、12980、NCA 1530、UK 563株(微工研菌第7275号、FERMP-7275、昭和58年9月29日寄託)等がある。

また、グルタミンシンセターゼ以外の酵素としては、微生物由来のもの、動物由来のものなど各種のものを使用することができるが、中でも上記の最適生育温度が50℃ないし85℃である微生物由来のものが好ましい。

本発明の試薬を用いて無機リンを測定するには、例えば、試薬を測定温度(25℃、30℃、37℃のい

- 9 -

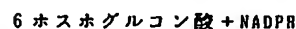
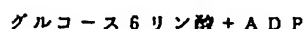
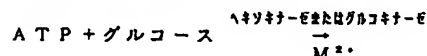
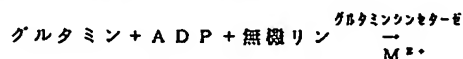
- 10 -

ずれてもよい。)に約3分間保温し、その後セル室を保温した分光光度計に入れたのち、サンプルを混合し、340nmにおける吸光度の上昇又は減少を測定すればよい。サンプルを混合した後の反応時間としては、1~30分間で任意に選択できるが、自動分析器の測定条件に適應するためには2~5分程度が好ましい。

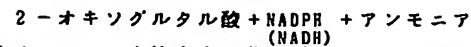
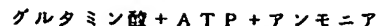
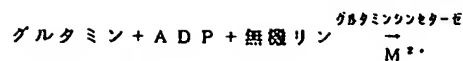
(作用)

本発明の試薬の測定原理を以下に示す。

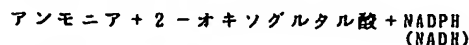
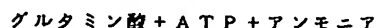
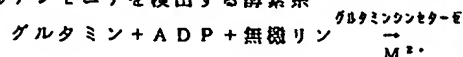
① ATPを検出する酵素系



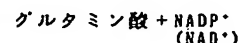
② グルタミン酸を検出する酵素系



③ アンモニアを検出する酵素系



グルタミン酸脱水素酵素



(実施例)

次に、本発明を実施例によって具体的に説明する。

実施例1

ADP 5 mM, NADP<sup>+</sup> 1.44 mM, L-グルタミン酸 50 mM, グルコース 20 mM, 塩化マグネシウム 20 mM, パチルス・ステアロサーモフィルス (*Bacillus stearothermophilus*) 由来のグルコキナ

- 11 -

ーゼ 5 U/mℓ (生化学工業社製), パチルス・ステアロサーモフィルス (*Bacillus stearothermophilus*) 由来のグルタミンシンターゼ 5 U/mℓ, ロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*) 由来のグルコース6リン酸脱水素酵素 1 U/mℓ (オリエンタル酵母社製) 及びイミダゾール-塩酸緩衝液 (pH 6.5) 50 mM からなる試薬を調製した。

次に、この試薬 0.5 mℓ を 37℃ で 3 分間加温して 340 nm における初期吸光度を測定した後、各種濃度の無機リン標準液 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶液) 0.02 mℓ を添加して 340 nm における吸光度変化を測定した。

その結果を第1図に示す。

第1図は 340 nm における吸光度変化量と無機リン濃度との関係を示したもので、無機リン濃度 30 mg/dℓ まで吸光度変化量と無機リン濃度とが直線関係にあることがわかる。

実施例2

実施例1で調製した試薬 0.5 mℓ を 37℃ で 3 分

- 12 -

間加温して 340 nm における初期吸光度を測定した後、各種濃度の無機リン標準液 0.02 mℓ を添加し、吸光度が一定になるまでの時間を測定した。

その結果を表1に示す。

表1

無機リン濃度 / dℓ	0.1	0.5	1	5	10	20	30
吸光度一定になるまでの時間 (分)	2.0	2.0	2.2	2.5	2.8	2.9	3.2

表1より、0.1~30 mg/dℓ の無機リン濃度に対して反応終結時間がほぼ3分以内であり、広い無機リン濃度範囲に対して極めて短時間に測定が終了することが明らかである。

実施例3

実施例1で調製した試薬 0.5 mℓ を 37℃ で 3 分間加温して 340 nm における初期吸光度を測定

- 13 -

- 14 -

した後、各種血清0.02mℓを添加して340nmにおける吸光度変化を測定して無機リン濃度を求めた。

また、市販のPhosphor B-Test（モリブデンブルー法、和光純薬社製）を用いて上記血清の無機リン濃度を測定して二者の相関性を調べた。

その結果を第2図に示す。

第2図は本発明の試薬を用いて測定した無機リン濃度と、市販のPhosphor B-Testを用いて測定した無機リン濃度との相関を示すもので、両者は極めて良い相関性を示している。

#### 実施例4

実施例1で調製した試薬0.5mℓに各種濃度のアスコルビン酸ナトリウム溶液0.1mℓを加え、37℃で3分間加温して340nmにおける初期吸光度を測定した後、3mg/ℓの無機リン標準液（ $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 溶液）0.02mℓを添加して340nmにおける吸光度変化を測定した。

その結果を第3図に示す。

第3図は340nmにおける吸光度変化量とア

スコルビン酸の濃度との関係を示すもので、アスコルビン酸の濃度に関係なく無機リンが測定できることが明らかである。

#### 実施例5

ADP 5mM、NADP<sup>+</sup> 1.44mM、L-グルタミン酸50mM、グルコース20mM、塩化マグネシウム20mM、グルタミン酸脱水素酵素20U/mℓ（ベーリンガー・マンハイム社製）、グルタミンシンセターゼ5U/mℓ及びイミダゾール-塩酸緩衝液（pH7.5）からなる試薬を調製した。

次に、この試薬0.5mℓを37℃で3分間加温して340nmにおける初期吸光度を測定した後、各種濃度の無機リン標準液（ $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 溶液）0.02mℓを添加して340nmにおける吸光度変化を測定した。

その結果を第4図に示す。

第4図は340nmにおける吸光度変化量と無機リン濃度との関係を示したもので、無機リン濃度30mg/ℓまで吸光度変化量と無機リン濃度とが直線関係にあることがわかる。

- 15 -

#### 実施例6

ADP 5mM、NADPB 0.26mM、L-グルタミン酸50mM、塩化マグネシウム20mM、グルタミン酸脱水素酵素10U/mℓ（ベーリンガー・マンハイム社製）、グルタミンシンセターゼ5U/mℓ、2-オキソグルタル酸5mM及びイミダゾール-塩酸緩衝液（pH7.0）からなる試薬を調製した。

次に、この試薬0.5mℓを37℃で3分間加温して340nmにおける初期吸光度を測定した後、各種濃度の無機リン標準液（ $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 溶液）0.02mℓを添加して340nmにおける吸光度変化を測定した。

その結果を第5図に示す。

第5図は340nmにおける吸光度変化量と無機リン濃度との関係を示したもので、無機リン濃度30mg/ℓまで吸光度変化量と無機リン濃度とが直線関係にあることがわかる。

（発明の効果）

本発明の試薬は、従来のモリブデンブルー法と

良好な相関を示すとともに、短時間で、かつ安価に、しかもアスコルビン酸の影響を受けずに、前処理をも必要とせずに試料中の無機リンを測定することができる。

その上、本発明の試薬は、溶液状態での保存安定性が極めて良い。

#### 4. 図面の簡単な説明

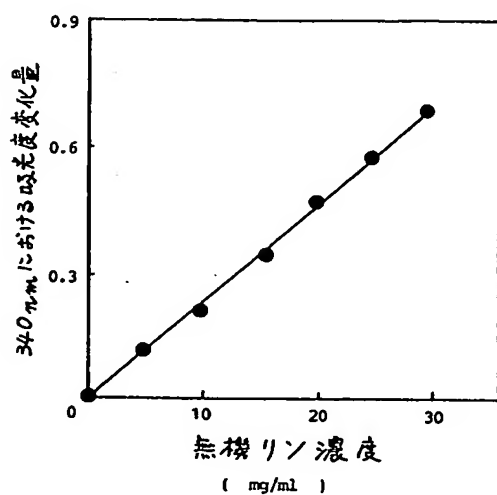
第1図、第4図及び第5図は340nmにおける吸光度変化量と無機リン濃度との関係を示すものであり、第2図は本発明の試薬を用いて測定した無機リン濃度と、市販のPhosphor B-Testを用いて測定した無機リン濃度との相関を示すものであり、第3図は340nmにおける吸光度変化量とアスコルビン酸の濃度との関係を示すものである。

特許出願人 ユニチカ株式会社

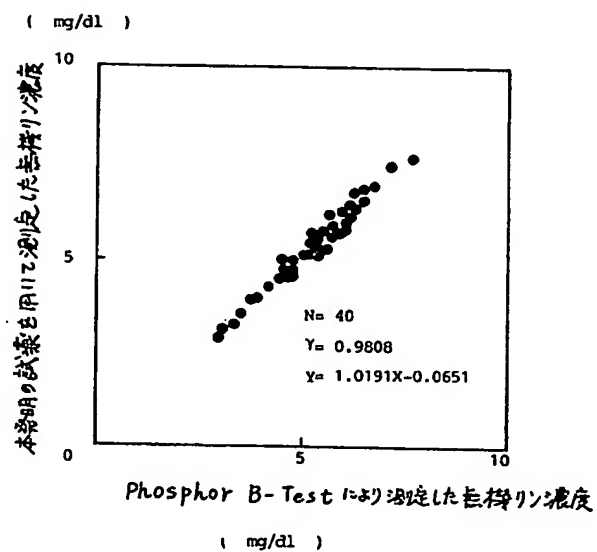
- 17 -

- 18 -

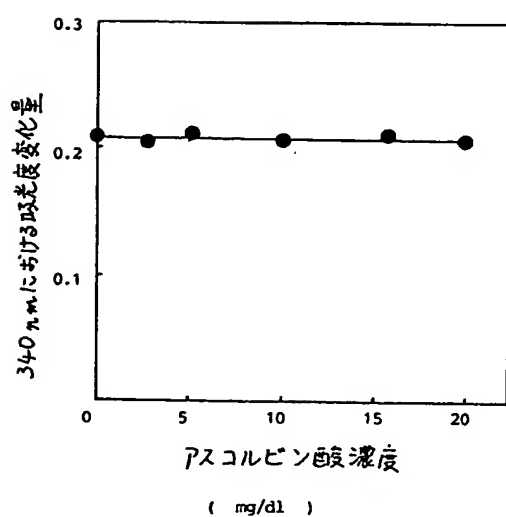
第1図



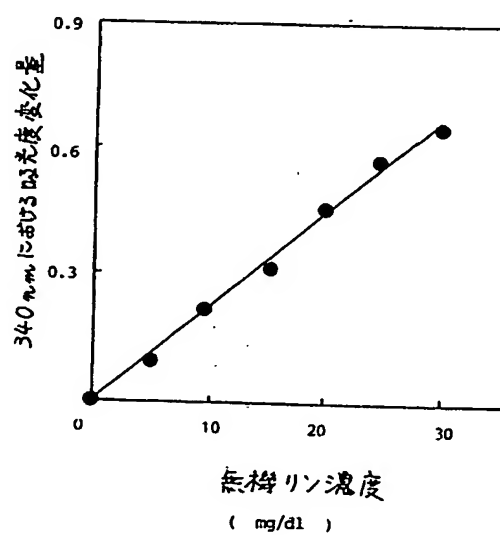
第2図



第3図



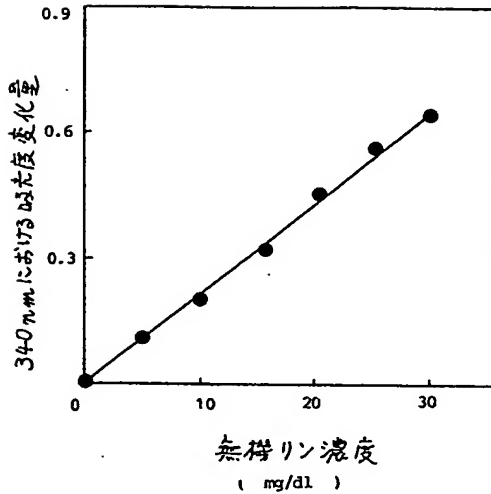
第4図



手続補正書 (自発)

昭和61年11月7日

第5図



特許庁長官 殿

1. 事件の表示

特願昭61-220100号

2. 発明の名称

無機リン定量用試薬

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 兵庫県尼崎市東本町1丁目50番地

名 称 (450) ユニチカ株式会社

代表者 平 田 豊

連 絡 先

〒541

住 所 大阪市東区北久太郎町4丁目68番地

名 称 ユニチカ株式会社 特許部

電話 06-281-5258 (ダイヤルイン)

4. 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄及び

第1図、第3～5図)

- 1 -

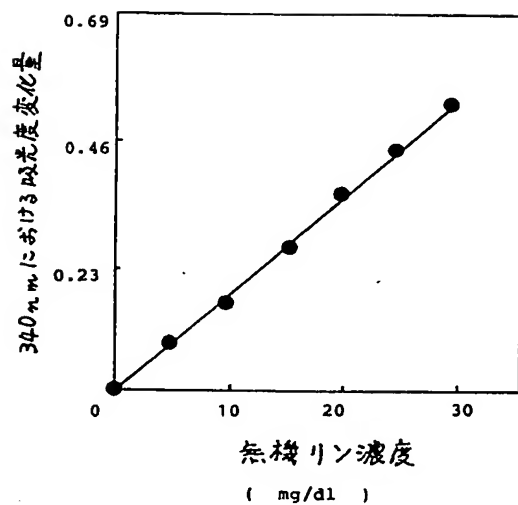


5. 補正の内容

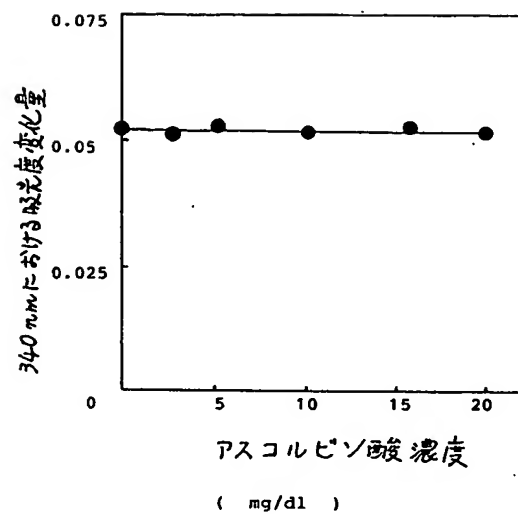
- (1) 明細書第2頁第6行の「多量」を「多数」と訂正する。
- (2) 同第2頁下から第2行の「年）」を「年及び49巻 88頁 1972年）」と訂正する。
- (3) 同第3頁第5行の「アグリカルチュラル バイオロジカル」を「アグリカルチュラル アンド バイオロジカル」と訂正する。
- (4) 同第3頁第6行の「Agricultural Biological」を「Agricultural And Biological」と訂正する。
- (5) 同第4頁第6行の「1. 3」を「1. 3」と訂正する。
- (6) 同第5頁第6行及び第7行の「β-グルコース 6リン酸」を「グルコース 6リン酸」と訂正する。
- (7) 同第8頁第1行及び第4行の「デヒドロゲナーゼ」を「脱水素酵素」と訂正する。
- (8) 同第11頁下から第3行の  
「グルコース 6リン酸 + NADP<sup>+</sup>  $\xrightarrow{\text{グルコース6リン酸脱水素酵素}} \text{M}^{2+}$ 」  
を  
「グルコース 6リン酸 + NADP<sup>+</sup>  $\xrightarrow{\text{グルコース6リン酸脱水素酵素}}$ 」  
と訂正する。

- (9) 同第12頁下第4行から下第3行、第16頁第5行から第6行及び第17頁第2行から第3行の「レーグルタミン酸」を「レ-グルタミン」と訂正する。
- 00 図面の第1図及び第3～5図を別紙のとおり訂正する。

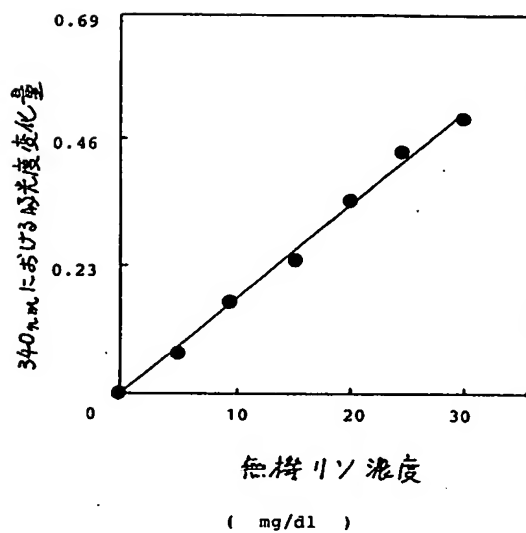
第1図



第3図



第4図



第5図

